PCT/EP 99/04411

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP99
4411



REC'D 16 AUG 1999
WIPO PCT

Bescheinigung

09/720943

Die WITA GmbH Wittmann Institute of Technology and Analysis of Biomolecules in Teltow/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren und Vorrichtung zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen"

am 3. Juli 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole B 01 D, C 07 K und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 21. Juli 1999

Der Präsident des Deutschen Patent- und Markenamts
Im Auftrag

Sieck

Aktenzeichen: 198 31 210.5

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG
PATENTANWÄLTE
European Patent Attorneys
Berlin - München

GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG Lützowplatz 11-13, 10785 Berlin

Klaus W. Gulde, Dipl.-Chem.
Jürgen D. Hengelhaupt, Dipl.-Ing. *
Dr. Marlene K. Ziebig, Dipl.-Chem.
Dieter A. Dimper, Dipl.-Ing.**

Lützowplatz 11-13
D-10785 Berlin

Tel.: 030/264 13 30
Fax: 030/264 18 38
e-mail: PatentAttorneys.GHZ@t-online.de
Internet: http://www.berlin-patent.net

Unser Zeich./our reference
P53998DE-HH
Datum/date
Berlin, 03.07.1998

WITA GmbH
Wittmann Instituts of Technology and
Analysis of Biomolecules
Warthestr. 21

14513 Teltow

Verfahren und Vorrichtung zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen

Verfahren und Vorrichtung zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen in Gelen durch Elektrophorese in einer Elektrophoreseapparatur und dient insbesondere der Auftrennung von beispielsweise Proteinen, Glycoproteinen, Lipoproteinen, Nukleinsäuren oder Zellkomplexen in Gelen (z. B. in Polyacrylamidgelen, Harnstoffgelen oder Agarosegelen) in zwei Dimensionen.

Proteine und Peptide sind Biopolymere, die zu Tausenden in jeder Zelle vorkommen; sie sind die unmittelbaren Genprodukte, die alle Zellprozesse katalysieren, stimulieren und regulieren. Ihre Struktur und Funktionsanalyse bildet die Basis für die Aufklärung aller wichtigen Zellvorgänge und ist die Grundlage zum Verständnis von Krankheitsprozessen auf der molekularen Ebene und in der molekularen Medizin, z.B. bei der Tumorentstehung und zur Entwicklung von Frühdiagnostika und neuen Therapeutika in der Pharmaindustrie. Wegen der oft sehr geringen Konzentrationen, in denen die Peptide und Proteine in der Zelle vorkommen, ist es notwendig, hochempfindliche Nachweismethoden und Trenntechniken für ihre Charakterisierung zu entwickeln.

Proteine sind aus langen Ketten von Aminosäuren aufgebaut und weisen eine für jedes Protein spezifische räumliche Struktur auf. Jedes Protein hat eine individuelle Aminosäurefolge, die Primärsequenz, die sich zu einer jeweils spezifischen Raumstruktur (3D-Struktur) auffaltet, die Träger der physiologischen Funktion im Zellgeschehen ist. Proteine nehmen als direkte Genprodukte eine zentrale Stellung bei allen Lebensprozessen ein. Sie katalysieren die biosynthetischen Vorgänge als Enzyme, bauen den Organismus als Strukturproteine auf, bewerkstelligen Stofftransport und Signaltransduktion und spielen eine wesentliche Rolle bei der Translation der Erbinformation (Proteinbiosynthese) und bei allen Regulationsvorgängen. Eine einzelne Zelle enthält über 5000 unterschiedliche Proteine. Biosynthese und Expression jedes Proteins sind genauestens reguliert. In unterschiedlichen Geweben kommen verschiedene Expressionsmuster zustande. Außerdem können posttranslationale Veränderungen in den Proteinen auftreten, wie z.B. Phosphorylierungen beim Hitzeschockprotein 27, die von physiologischer Bedeutung sind und in der zwei-dimensionalen Elektrophorese ein charakteristisches Muster nach immunchemischer Anfärbung im Western-Blot ergeben. Daher ist es wichtig, die Expression nicht nur auf der Gen- und Botennukleinsäure (mRNA)-Ebene zu studieren, sondern auch die Proteine, ihre Zusammensetzung und Konzentration in den unterschiedlichen Zellen und Geweben, besonders beim Menschen, genauestens zu kennen. Nach der Totalsequenzierung ganzer Genome, wie z.B. dem aus Hefe oder wie im Humangenomprojekt konzipiert, kommt daher der Erforschung der Proteine und ihren Zellfunktionen eine zentrale Bedeutung zu. Wenn in einigen Jahren das menschliche Genom mit ca. 100.000 Genen bekannt sein wird, werden sich die Wissenschaftler mehr und mehr der Erforschung der durch die Gene kodierten Proteine zuwenden müssen, was unter dem Begriff

Proteomforschung zusammengefaßt wird. Nur ein Bruchteil dieser wichtigen Biomoleküle ist bisher auf der molekularen Ebene bekannt. Ohne die Strukturinformationen können jedoch die Vorgänge des Zellstoffwechsels und seiner regulatorischen Zusammenhänge nicht verstanden werden. Dies ist besonders bei der Aufklärung der Entstehung von Krankheiten unumgänglich. Viele der über 5000 Zellproteine sind weder in ihrer Struktur noch in ihrer Funktion bekannt. Um ihre biologische Bedeutung und physiologische Rolle zu verstehen, werden in modernen Forschungsprojekten Totalzellextrakte oder die Gesamtproteine aus Einzelzellinien in hochauflösenden zwei-dimensionalen Gelelektrophoresen (2DE) getrennt und sichtbar gemacht. Zellextrakte aus verschiedenen Gewebeproben, z.B. aus Tumorgewebe, können so miteinander und mit gesunden Gewebeproben verglichen und die Proteine durch proteinchemische und massenspektrometrische Analysen identifiziert und charakterisiert werden. Auf diese Weise lassen sich krankheits-assoziierte Proteine nachweisen, die als Marker zur Früherkennung der Krankheiten dienen oder den jeweiligen Grad der Krankheit, z.B. bei der Tumorentstehung, präzise charakterisieren können.

Da die Proteine oft nur in kleinsten Mengen exprimiert werden, ist es wichtig, hochsensitive Verfahren zur Trennung und Identifikation zu entwickeln. Um die ehrgeizigen, in die Zukunft weisenden Forschungsprojekte in Zusammenhang mit der Genomfunktionsanalyse bewerkstelligen zu können, sind neue, innovative Trenn- und Analyse-Techniken vonnöten.

Ein- und zwei-dimensional durchgeführte Gelelektrophoresen von Proteinen, Nukleinsäuren, oder anderen Biomolekülen sind seit langem in der Biochemie, der pharma-

zeutischen Industrie, Medizinforschung und Laborpraxis eingeführte Techniken, um schnelle Auftrennungen, Vergleiche von Trennmustern oder Qualitätskontrollen von Isolaten und Produkten durchzuführen. Die Elektrophoresekammern und ihr Zubehör (Powersupply, Kühlsysteme, Detektoren) sind längst zu unumgänglichem Inventar in jedem naturwissenschaftlichen, pharmazeutisch oder labormedizinisch ausgerichteten Laboratorium geworden.

Für die Trennung von Biomolekülen in einer Trennrichtung (ein-dimensionale Elektrophorese, 1DE) stehen zahlreiche Elektrophoresekammersysteme und Trennmethoden zur Verfügung, die je nach anstehendem Trennproblem auf die speziellen Anwendungen adaptiert sind. Die Trennung einzelner Proben erfolgt zumeist in Kapillarröhrchen oder Gelstreifen und die Trennung multipler Proben wird zumeist in Flachgelen (Slabgelen) durchgeführt, bei denen Auftragstaschen am oberen Ende einer dünnen auspolymerisierten Gelschicht ausgespart sind. Diese Geltaschen werden beim Gießen durch Einbringung von sogn. Kämmen während der Polymerisation vorbereitet. In diese Taschen werden nach Polymerisation des Geles und Entfernung der Kämme die Proben eingebracht. Für Trennungen komplexer Protein- und Peptidmischungen in langen Gelen (>10 cm) stehen weit weniger Kammersysteme zur Verfügung.

Die Auftrennung in zwei verschiedenen Dimensionen (2DE), bei denen unterschiedliche Bedingungen für die Auftrennung in den beiden Dimensionen gewählt werden (z.B. erste Dimension: Trennung nach Ladung, zweite Dimension: Trennung nach Molekülgröße) stehen keine einfach handbaren Komplettsysteme zur Verfügung, die sich zur Vollautomatisierung eignen. Gewöhnlich muß bei diesen Elektrophoresen jede Dimension in einer anderen Kammer durchgeführt und das nach der ersten Dimension

gewonnene Trenngel auf das vorbereitete Gel der zweiten Dimension manuell aufgebracht und dort einpolymerisiert werden. Erst dann kann die elektrophoretische Trennung der Probe in der zweiten Dimension erfolgen. Die manuell durchgeführten Teilschritte sind zeitaufwendig, erfordern viel Geschicklichkeit und erlauben eine Perfektion und Reproduzierbarkeit nur bis zu einem gewissen Grad, in Abhängigkeit von der Person, die die Handhabung durchführt.

1DE Trennnungen von Proteinen und Peptiden werden zumeist in kleinen Kammern in 5-11 cm langen polymerisierten Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Quervernetzung und unterschiedlicher Dicke (z.B. 0.7 bis 1.5 mm) und Breite durchgeführt (in sogn. Slabgele). Hierzu werden auf das in flüssiger Form zwischen zwei Glasplatten gegossene Gel nach Polymerisierung die Proben aufgetragen und in einer Elektrophoreseapparatur für mehrere Stunden bei 500 bis 2000 Volt/20 cm aufgetrennt. Danach wird das Gel entnommen und zur Anfärbung der Substanzen in eine Färbelösung getaucht; danach zur Entfernung des Überschusses an Farbstoff in einer Entfärbelösung entfärbt und dabei werden die Substanzen sichtbar. Sie können durch Photographie oder durch Einscannen im Computer in ihrer Lage auf dem Gel dokumentiert werden, z.B. für Vergleiche mit anderen Proben. Es können zwischen dünnen Glasplatten auch sogn. trägerfreie Elektrophoresen durchgeführt werden, bei denen die zu trennenden Substanzen in einem dünnen Pufferfilm ohne jedweden Träger elektrophoretisch aufgetrennt werden. Für andere Biomoleküle, wie Nukleinsäuren oder hochmolekulare Komplexe werden z.B. auch Agarosegele zur Trennung verwandt.

Alternativ zu den Slabgelen hat sich die Trennung in der ersten Dimension auch in feinen Glaskapillaren (i.D. 0.7 bis 1.5 mm) bewährt, in die die zunächst flüssige Gelmischung zur Polymerisation eingebracht wird und die Substanzmischung danach von oben eingespritzt wird. Die Kapillaren werden zunächst in einem Gelgießständer mit Gel versetzt, dann dort polymerisiert und erst nachdem sie in die Elektrophoresekammer verbracht worden sind, mit der Probensubstanz befüllt.

Nach der Durchführung der unter Hochspannung aufgetrennten Proben müssen die Gele, die sehr weich und flexibel sind, vorsichtig aus den Kapillaren zur Einbringung in die Färbe-/Entfärbelösung ausgestoßen werden, wobei mechanische Defekte an den Gelen entstehen können. Wegen der schwierigen Handhabung werden zunehmend auch schmale Flachgele (2 x 5-10 cm dünne Streifengele), die als getrocknete Fertiggele kommerziell zur Verfügung stehen, für die 1DE verwandt (z.B. von der Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg).

Zur Trennung in der zwei-dimensionalen Technik (2DE) müssen die Gele aus der ersten Dimension (die Gele aus den Kapillaren oder die Gelstreifen) für die Auftrennung in der zweiten Dimension durch manuelle Manipulation auf ein entsprechend vorbereitetes Flachgel (Slabgel), das bereits vorpolymerisiert ist, aufgebettet und auf dieses Flachgel aufpolymerisiert werden. Erst danach kann die Trennung in der zweiten Dimension in der entsprechenden Elektrophoresekammer für die 2. Dimension durchgeführt werden. Nach der Trennung erfolgt die übliche Färbungs- und Entfärbungstechnik und Dokumentation der Ergebnisse. Verschiedene Gele und Puffersysteme für die Durchführung von gelelektrophoretischen Proteintrennungen in zwei Dimensionen sind be-

schrieben worden: In der zuerst beschriebenen Version werden z.B. Gemische von ribosomalen Proteinen in Harnstoffgelen getrennt, bei denen die pH-Bedingungen in den beiden Dimensionen variiert werden. Verfahren zur Auftrennung von hoch komplexen Proteinmischungen, z.B. aus intakten Zellen, Zellinien oder Geweben nutzen in der ersten Dimension Trennungen auf Grund verschiedener Ladung der Proteine durch Isoelektrofokussierung (IEF) und in der zweiten Dimension Trennungen nach Molekülgröße in SDS-Natrium-dodecylsulfat-Gelen. Für die Durchführung der Isoelektrofokussierung werden entweder Immobilone oder Ampholine benutzt, die in das Gel eingebracht werden. Mit der letzteren Technik gelingt es mehr als 10000 Proteine eines Zelllysates aufzutrennen; die erstere Technik mit Immobilonen ist für Trennungen von etwa 2000 Proteinen konzipiert. Bei Verwendung von Ampholiengradienten sind Trennungen von mehr als 10000 Proteinen beschrieben worden (Klose und Kobalz, 1995) Diese hochauflösenden Proteingelelektrophorese-Techniken werden für die moderne Proteomforschung, die Ermittlung der exprimierten Proteine einer Zelle und ihrer krankhaften Veränderungen, z.B. bei der Untersuchung der Tumorentstehung, genutzt. Die Krankheits-assoziierten Proteine können nach Auftrennung in der hochauflösenden zwei-dimensionalen Gelelektrophorese mittels proteinchemischer und massenspektrometrischer Verfahren identifiziert werden.

Die US 4,666,581 beschreibt eine Vorrichtung zur zweidimensionalen Elektrophorese, bei welcher jedoch beide Gele nur in räumliche Nähe gebracht werden. Statt manueller Handhabung, die schwierig und fehlerbehaftet ist, wird hier eine Mechanik, ein komplizierter Drehmechanismus, zum Übertragen des Geles von der ersten Dimension zur zweiten Dimension eingesetzt. Die Puffergefäße sind nicht integriert. Der Stromfluß muß

auf komplizierte Art und Weise über Filterstreifen sichergestellt werden.

Mit der US 4,874,490 wird ebenfalls ein System zur zwei-dimensionalen Elektrophorese beschrieben, wobei das Patent kein vollständig integriertes System offenbart und ein Gelgießgestell benötigt. Auch sind die Puffergefäße für die kathodischen und anodischen Pufferlösungen nicht integrale Bestandteile der Kammer. Weiterhin ist in diesem System keine Kühlung integriert. Es erfolgt die Trennung der ersten Dimension horizontal und in der zweiten Dimension vertikal. Die Gele müssen in der beschriebenen Konstruktion zwingend nacheinander in mehreren Schritten gegossen werden. Es muß zuerst die zweite Dimension in einem konventionellen Gießständer außerhalb der Elektrophoresekammer gegossen werden. Nach dem Gießen müssen über das Gel der zweiten Dimension Dicht-/Isolierstreifen durch mechanische Manipulation eingefügt werden. Danach erst kann das Gel für die erste Dimension gegossen werden. Anschließend wird der Spacer wieder entfernt. Die Probenaufgabe in größeren Mengen ist ungelöst. Beschrieben ist nur das Tränken einer Membran. Die Aufgabemenge und deren Aufkonzentrierung ist beschränkt.

Weiterhin beschreibt die DE 4244082 A1 sowie die US 5,407,546 ein Verfahren und eine Vorrichtung zur hochauflösenden zwei-dimensionalen Elektrophorese. Wesentlich hierbei ist die selektive Rehydratisierung. Es wird ausdrücklich ein zusammenhängendes Gel ("Ein-Molekül") verwendet. Als Ausgangsmaterial können nur getrocknete Gele verwendet werden und diese müssen rehydratisiert und reäquilibiriert werden. Das geschieht vor und nach der ersten Dimension und gesondert wird das Gel der zweiten Dimension rehydratisiert. Es ist kein vollautomatischer Ablauf möglich, da das Gel der

ersten Dimension in ein geheiztes Äquilibratorgefäß transferiert und umgepuffert werden muß. Damit liegt keine vollständige Integration vor.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zu schaffen, mit welchen mit einfachen Mitteln in einer einzigen Apparatur mit selbstgegossenen Gelen und/oder getrockneten Fertiggelen effektive Gelelektrophoresen der ersten und zweiten Dimension durchgeführt werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Merkmale im kennzeichnenden Teil der Ansprüche 1 und 9 im Zusammenwirken mit den Merkmalen im Oberbegriff. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen enthalten.

Ein besonderer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß eine Vollautomatisierung der gesamten 2DE einfach durchgeführt werden kann, indem die Gele für die Trennung in der ersten Dimension und die Gele für die Trennung in der zweiten Dimension nacheinander oder gleichzeitig vertikal zueinander angeordnet, als Gießgele oder Fertiggele in eine Elektrophorese-Kombikammer eingebracht und im Falle der gegossenen Gele voneinander isoliert polymerisiert werden, nachfolgend Pufferlösungen eingefüllt, z.B. ein Proteinextrakt auf die Gele der ersten Dimension aufgetragen und die elektrophoretische Auftrennung der ersten Dimension bei konstanter Temperatur oder bei fixiertem Temperaturgradienten mit z.B. ansteigender elektrischer Spannung durchgeführt, anschließend die Pufferlösung abgesaugt, die Isolierung aufgehoben, in die entstehenden Räume zwischen erster und zweiter

Dimension Kontaktgel eingefüllt und auspolymerisiert, Pufferlösungen eingefüllt und die elektrophoretische Trennung der zweiten Dimension bei präzise eingestellter Temperatur und konstanter elektrischer Leistung oder steigender Stromstärke durchgeführt wird und abschließend die Gele z.B. mit Färbelösung entwickelt und die Proteine mit herkömmlichen Methoden auf den Gelen sichtbar gemacht werden.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß die zwei-dimensionale Trennung in der erfindungsgemäßen Elektrophorese-Kombikammer nur mit einer einzigen Vorrichtung bewerkstelligt wird, die für die Durchführung beider Elektrophorese-Dimensionen eingerichtet ist und die Elektrophorese-Kombikammer einen Kern mit Kühlelementen aufweist, wobei die Kühlelemente beidseitig des Kerns durch aus inneren Platten und äußeren Platten im Zusammenwirken mit entfernbaren oder schaltbaren Isolierelementen gebildeten Gelkammern und Puffergefäßen angeordnet sind.

Ein zusätzlicher Vorteil der Erfindung besteht darin, daß das Gießen der Gele vor dem Auftrag der Substanzen im neuen Kammersystem in demselben Raum erfolgt, in dem auch die Trennungen selber in den beiden Dimensionen der Elektrophorese durchgeführt werden. Es entfallen daher zwei separate Gelgießständer (jeweils einer für die erste und für die zweite Dimension). Die Gele für die beiden Elektrophorese-Dimensionen werden vor Beginn der Substanztrennung in der Elektrophorese-Kombikammer vorbereitet und stehen beim Start der jeweiligen Elektrophoresen bereit. Alle Manipulationen zum Gießen der Gele werden in einem Arbeitsgang vor Beginn des Probenauftrags gemacht.

Ebenfalls vorteilhaft ist eine optimale Kühlung, die sowohl in der Elektrophoresekammer (für beide Dimensionen) als auch in den Pufferkammern für beide Dimensionen sichergestellt wird.

In bisherigen Techniken werden die Gele und die Pufferlösungen der ersten Dimension zumeist gar nicht gekühlt und die bisher realisierten Kühlungen für die 2. Dimension weisen Mängel auf (Temperaturdifferenzen innerhalb der Gele; ungenügende Kühlung der Puffer).

Variable Programmierungen des Elektrophoreseablaufes (Stufenprogramme, Gradientenprogramme, Temperaturprogramme etc.) lassen sich ausführen.

Die Elektrophorese-Kombikammer läßt sich auch für eindimensionale Trenngele variabler Länge (z.B. 10 bis 30 cm) für die Auftrennung multipler Proben verwenden. Die Trennungen können in der Kombikammer reproduzierbar unter genau festgelegten Standardbedingungen durchgeführt werden.

Ebenso ist es auch möglich, die Elektrophorese-Kombikammern für die Auftrennung mehrerer Proben, z.B. 20 Proben, in einem ein-dimensionalen SDS-Gel zu benutzen, wobei die Proben mit Hilfe eines Auftragskammes auf dem Gel der 2. Dimension aufgebracht werden. Ein entsprechender Einsatz mit Probentaschen wird eingebracht, wo sonst das Gel für die 1. Dimension enthalten ist.

Die erfindungsgemäße Elektrophoresekombikammer enthält vorzugsweise zwei mal zwei Gele, deren Zahl sich beliebig erweitern läßt. Die Gelpaare für die Trennung in der ersten Dimension werden parallel elektrophoretisch entwickelt und sind zunächst von den Gelen für die Durchführung der zweiten Dimension durch eine nichtleitende Isolierung getrennt, die danach beispielsweise mechanisch von außen ohne Aufschrauben der Kammer ent-

fernt und durch ein leitendes Medium ersetzt wird, das die Kontakte zu den Gelen für die Durchführung der zweiten Dimension herbeiführt. Die Gele für die erste und zweite Dimension werden jeweils paarweise nacheinander unter verschiedenen Bedingungen entwickelt, ohne daß das Gel von der ersten Dimension auf die zweite mechanisch transferiert werden muß. Die Elektrophorese-Kombikammer hat für beide Dimensionen eine integrierte Kühlvorrichtung und integrierte Füll- und Puffergefäße. Der Deckelaufsatz der Elektrophorese-Kombikammer enthält die elektrischen Sicherheitsverbindungen für die Verbindung mit dem Powersupply, die Verbindungen zum Kühlaggregat und alle notwendigen Einfüllstutzen für das Gießen der Gele, für das Eingießen der Elektrolysepuffer und die Einführung der Probe.

Die erfindungsgemäße 1DE/2DE-Elektrophorese-Kombikammer dient z.B. der Trennung von komplexen Proteinmischungen für die Auftrennung von Proteinen aus Geweben, Zelllinien oder Mikroorganismen, die mehr als 5000 Proteine enthalten können. In der Elektrophorese-Kombikammer können sowohl analytische als auch präparative Elektrophoresen durchgeführt werden, wobei je nach Stoffklasse z.B. isoelektrische Fokussierung und SDS-Elektrophorese oder Trennungen in Agarose, Harnstoff oder anderen Trennmedien Verwendung finden können. Die Kammer ist thermostatisierbar, enthält alle Puffergefäße für die Durchführung der ersten und zweiten Dimension und einen Aufsatz, der es erlaubt die Elektrophoresen unter hohen Spannungen z.B. bis 5000 Volt durchzuführen. Die Elektrophorese-Kombikammer dient z.B. der Identifizierung von krankheitsassoziierten Proteinen, zur Entwicklung von Markerproteinen bei der Erstellung von Frühdiagnosen von Krankheiten und zur Entwicklung neuartiger Pharmaka. Zellprozesse wie Embryonalentwicklung, Transport- und Signaltransduktionsprozesse und Regulations-

und Expressionsmuster können mit Hilfe der Elektrophorese-Kombikammer studiert werden. Sie eignet sich zur Auflösung von >5000 Proteinen und ist damit ein vorzügliches Instrument für die Untersuchung in der Proteomforschung, einem neuen Forschungs- und Entwicklungsgebiet in der medizinischen und pharmazeutischen Grundlagenforschung und für industrielle Anwendungen, z.B. bei der Untersuchung ganzer Zellinhalte und ihrer Veränderungen oder zur Untersuchung des Einflusses von Pharmaka auf die Zellprozesse.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von in den Figuren dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert werden. Es zeigen:

Fig. 1 eine Explosivdarstellung der wesentlichen Konstruktionsteile der Elektrophorese-Kombikammer,

Fig. 2 den Aufbau des inneren Kernes,

Fig. 3 den inneren Kern mit angeordneter innerer Platte,

Fig. 4 die Elektrophorese-Kombikammer mit eingelegten Dichtungen und angeordneten Isolierungen,

Fig. 5 die Elektrophorese-Kombikammer, einseitig komplett montiert mit Druckrahmen.

Die Elektrophorese-Kombikammer 1 zur Trennung von beispielsweise komplexen Proteinmischungen ermöglicht die elektrophoretische Trennung nacheinander in zwei verschiedenen Dimensionen, d.h. unter verschiedenen Bedingungen.

Wie in Fig. 1 zu ersehen ist, besteht die Elektrophorese-Kombikammer 1 aus mehreren Teilen, die miteinander durch Verschraubung zusammengesetzt werden: den inneren Kern 2 zur effektiven Kühlung, beidseitig damit

verbunden die inneren Platten 4 und die äußeren Platten 5, zwischen denen sich beiseitig je ein freier Raum für ein Flachgel (1. und 2. Dimension) befindet. Mit Hilfe einer Dichtung 19 werden diese Platten 4,5 gegeneinander gedichtet und gleichzeitig die Dicke des Geles festgelegt (z.B. 0.75 mm oder 1.5 mm). Während die innere Platte 4 aus einem gut die Temperatur leitenden Material gefertigt ist (z.B. einer speziellen gut leitenden Keramik, dünner Kunststoff), ist die äußere Platte 5 vorzugsweise aus einem transparenten Material (z.B. Glas), um maximale Durchsicht zu gewähren. Die äußeren Platten 5 werden durch beidseitiges Anschrauben je eines Druckrahmens 13 gehalten; Klammern werden nicht, wie sonst üblich, verwandt. Die untere Begrenzung der Elektrophorese-Kombikammer 1 ist durch einen justier- und drehbaren Tisch gegeben, auf dem die Elektrophorese-Kombikammer 1 mittenfixiert ist. Auf der Elektrophorese-Kombikammer 1 befindet sich ein Aufsatz in Form eines Deckels 14, in den Zulauf 11 und Ablauf 12 für das thermostatisierte Kühlwasser und Einleitungen für die Puffergefäße 8 und 21 der ersten und zweiten Dimension (jeweils für den Anoden- und Kathodenpuffer), für Einfüllstutzen und die Zuführungen der Elektroden eingearbeitet sind. Die Einleitungen für die Puffergefäße 8 und 21 dienen zunächst als Einfüllstutzen für das Eingießen der Gelflüssigkeiten. Der innere Kern 2 und die Druckrahmen 13 sind z.B. aus Polymermaterial (z.B. Acrylglas, Plexiglas) gefertigt und im Druckrahmen 13 sind Fenster in der Größe der Gele ausgespart, damit die Gießvorgänge der Gele und die Durchführung der Elektrophoresen leicht von außen beobachtet werden können.

Der innere Kern 2 (Fig. 2) und die zwei inneren Platten 4 werden vom Hersteller verklebt (Fig. 3). Weiterhin sind Puffergefäße 8 und 21, die teilweise gleichzeitig

Füllkammern für die Gele sind, angeordnet. Die inneren Platten 4 schließen das Kühllabyrinth 10 (Kühlmäander) dicht ab, haben aber Öffnungen zu den Puffergefäßen 8 der ersten Dimension (Puffer, 1. Dim.) und Puffergefäßen 21 der zweiten Dimension (Puffer 2. Dim.), wie in Fig. 2 und 3 dargestellt. Die Kühlelemente 3, 10 sind unter den Gelen lokalisiert und kühlen nicht nur die Gele der ersten (Gel 1) und zweiten Dimension (Gel 2), sondern auch die Puffergefäße (Puffer 1. Dim und Puffer 2. Dim.).

In der Figur 3 (Kern komplett verklebt; muß nach den Elektrophoresen nicht demontiert werden) ist rechts oben die Füllkammer 8 für das 1. Dim. Gel mit Füllröhre 17a für Gel 1 und gleichzeitig die Pufferkammer 8 für die erste Dimension (Lauf 1. Dimension) wiedergegeben.

Außerdem sind links oben die Füllkammer 17b mit Füllrohr für das 2. Dim. Gel und gleichzeitig die Puffergefäße 21 für die 2. Dimension (Lauf 2.Dim.) dargestellt. Die linke Füllkammer 17b endet unten mittig, um ein gleichmäßiges Eingießen der Gelflüssigkeit von unten nach oben zu ermöglichen, wobei eine Entlüftungsöffnung 18 mit einer schräg ausgebildeten oberen Begrenzung für ein gleichmäßiges, langsames und Luftblasen-freies Eingießen sorgt.

In einer speziellen Ausführungsform ist die Elektrophorese-Kombikammer 1 oberflächenbeschichtet. Es handelt sich dabei um eine Oberflächenbeschichtung der die Medien Gel, Gellösungen und Pufferlösungen berührenden Teile mit amorphen Kohlenstoffschichten. Vorteile der Beschichtung sind, daß durch niedrige Oberflächenenergie ein Anhaften von Medienbestandteilen verhindert (analog zu Teflon) und somit die Entnahme des Gels nach der Trennung sowie die Reinigung des

Gerätes erleichtert wird, die Schicht eine Hartstoffschicht ist und somit eine hohe Kratzfestigkeit aufweist und thermisch stabil ist. Alternativ können diese Oberflächen auch silanisiert werden.

Zur Durchführung der Elektrophorese werden folgende Arbeitsschritte absolviert:

1. Im ersten Arbeitsschritt wird auf den kompletten Kernaufbau eine zweiteilige Dichtung 19 aufgelegt (Fig. 4).
2. Dann werden im zweiten Arbeitsschritt Isolierschläuche 9 (z.B. 0.75-1.5 mm Rundschläuche oder viereckiges Material, z.B. Silikon), in vorgegebene Vertiefungen eingezogen (Fig. 4). Diese dienen der seitlichen Abgrenzung des 1.Gels von dem 2. Gel und der seitlichen Begrenzung des 2. Gels nach außen.
3. Als dritter Arbeitsschritt wird die äußere Glasplatte 5 aufgelegt.
4. Im vierten Schritt wird der Druckrahmen 13 aufgelegt und mit den Schrauben festgespannt (Fig. 5).
5. Im fünften Schritt wird der bisher entstandene Körper umgedreht und Schritt 1-4 für die Vorbereitung der Parallelgele analog wiederholt.
6. Im sechsten Schritt werden die zwei Gele in die zwischen den Isolierschläuchen 9 gebildete Gelkammern 6 für die erste Dimension gegossen, danach sogleich die zwei Gele in die Gelkammern 7 für die zweite Dimension.
7. Der Deckel 14 wird aufgesetzt und die Polymerisierung wird z.B. über Nacht vorgenommen.
8. Danach werden die Pufferlösungen eingefüllt und dann kann der Proteinextrakt nach hochtourigem Zentrifugieren auf die 1. Dim. Gele aufgetragen werden.

9. Dann erfolgt die elektrophoretische Auftrennung in der ersten Dimension.
10. Danach wird der 1. Dimension-Elektrophoresepuffer abgesaugt und die beiden Isolierschläuche 9, die die 1. Gele von den 2. Gelen trennen, von außen herausgezogen, was sehr leicht vonstatten geht, und die entstehenden freien Kapillaren zwischen den Gelen durch Einfüllen von Stackinggelflüssigkeit befüllt, so daß nach Polymerisierung dieser Flüssigkeiten der Kontakt zwischen dem jeweils ersten und zweiten Gel gegeben ist.
11. Dann wird die Elektrophorese in der zweiten Dimension durchgeführt.
12. Nach Durchführung der Elektrophorese in der zweiten Dimension werden die Verschraubungen gelöst, die Gele zusammen mit den äußeren Glasplatten 5 abgelöst und in ein Färbe- und Entfärbebad gegeben. Danach sind die Gele für die Dokumentation bereit.
13. Die Durchführung neuer Gele ist nach Säuberung der Gelplatten und der Füll- und Puffergefäße sofort wieder möglich.

Durch Montage mehrerer Einheiten können bis zu 10 2DE-Gele in einem Arbeitsgang durchgeführt werden.

Beim Gießen der Gele der ersten Dimension werden die Gele als Flachgele in dem durch Füllrohr 17a und Gelkammer 6 gebildeten U-Rohr gegossen und polymerisieren dort aus. Dazu wird zuerst ein Stopgel mit hoher Quervernetzung gegossen, das den unteren Bereich des U-Rohrs ausfüllen soll. Die nach Zugabe eines Polymerisationsstarters noch flüssige Gellösung wird hierfür in das äußere Pufferreservoir der ersten Dimension gegeben, wobei das Gel nur den unteren Bereich des U-Rohres ausfüllt. Es reicht etwa 10 mm über das untere Ende der

beiden als Isolierschläuche ausgebildeten Isolierelemente hinaus.
Nach dem Auspolymerisieren wird das Separationsgel für die erste Dimension gegossen. In diesem Gel wird die Proteintrennung z.B. durch Isoelektrofokussierung durchgeführt. Zum Gießen wird die noch flüssige Separationsgellösung in das zweite (weiter innen gelegene) Pufferreservoir der ersten Dimension über die Füllkammern 8 eingegossen, bis der Bereich der ersten Dimension zwischen den beiden Isolierelemente 9 vollständig gefüllt ist. Das Gießen der Gele erfolgt unter konstanter Temperatur, (z.B. bei 20 °C, wozu die Kühlung angeschaltet ist) bis das Gel auspolymerisiert ist.

Das Gel der zweiten Dimension wird zwischen den beiden Isolierelementen 9 von unten in die Apparatur eingegossen, indem die Gellösung über das Gießreservoir der zweiten Dimension eingefüllt wird. Die Gellösung fließt von dort über das Füllrohr 17b nach unten und tritt in der Mitte der Gelkammer 7 aus. Die Luft wird durch den Gießvorgang automatisch nach oben verdrängt und kann über die Entlüftungsöffnung entweichen, bis die Gellösung den Bereich der zweiten Dimension vollständig gefüllt hat.
Das Gel polymerisiert bei konstanter Temperatur (z.B. durch Kühlung auf 20°C) aus.

Im folgenden wird die Durchführung der ersten Dimension beschrieben.
Die beiden Pufferreservoire (8) der ersten Dimension werden einmal mit einer alkalischen und einer sauren Pufferlösung gefüllt (z.B. 0,1N NaOH; 7% v/v H3PO4). Die eine Pufferlösung fließt dabei in das U-Rohr bis zum Stopgel hinein, während die andere das Separationsgel überschichtet. Das Separationsgel wird dann mit einer Schutzlösung höherer Dichte als der Puffer über-

schichtet (z.B. 6% (w/v) Glycerin, 4 M Harnstoff, 1,5% (w/v) Ampholyte in H2O). Die Proben können durch Unterschichten unter die Schutzlösung auf das Separationsgel der 1. Dimension über Einfüllöffnung 20 aufgetragen werden. Die elektrophoretische Trennung erfolgt dann z.B. unter konstanter Temperatur (z.B. Kühlung auf 18 °C) mit einem Spannungsgradienten von anfänglich z.B. 100V bis z.B. 3000V über meherer Stunden. Nach dem Ende der Trennung werden die Pufferlösungen abgesaugt.

Bei der Durchführung einer 2DE muß die Probe immer auf das Gel der ersten Dimension aufgetragen werden; die aufgetrennten Banden nach der ersten Dimension werden dann in der zweiten Dimension weiter aufgetrennt.

Vor Beginn der elektrophoretischen Trennung in der zweiten Dimension werden die drei Isolierelemente 9 durch Herausziehen nach außen entfernt. Der Hohlraum zwischen den Gelen der ersten und zweiten Dimension wird mit einem Kontaktgel (z.B. Agarose) gefüllt, das schnell auspolymerisiert. Dann werden die beiden Puffergefäße 21 der zweiten Dimension mit Laufpuffer (z.B. SDS-Laufpuffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 5 μM Bromphenolblau in H2O) gefüllt. Die Trennung erfolgt unter Temperierung auf z.B. 15 °C, z.B. bei konstanter Leistung oder mit einer Stromstärke von z.B. 40 mA pro Gel in den ersten 20 Minuten und dann mit 75 mA pro Gel. Die Trennung ist mit Erreichen des Markerfarbstoffes Bromphenolblau am Ende des Geles beendet. Die Elektrophorese-Kombikammer wird auseinandergeschraubt und das Gel zur Entwicklung und Färbung entfernt.

Das Elektrophoresegel wird nun nach Stand der Technik weiterbehandelt und z.B. in eine Wanne mit Fixierlösung gegeben. Durch Silberfärbung können die Proteine in ng-Mengen für analytische Zwecke sichtbar gemacht werden

oder mittels z.B. Coomassie Brilliant Blue für mikropräparative Zwecke (z.B. anschließender enzymatischer Spaltung und Sequenzierung) behandelt werden. Alternativ kann das Gel nach Blotten für Immunofärbungen mit entsprechenden Antikörpern entwickelt werden. Diese Schritte sind nicht Bestandteil der Erfindung, aber unerläßlich, um die Proteine nach erfolgter Trennung sichtbar zu machen.

Die Gele werden im vorliegenden Ausführungsbeispiel als Flachgele (nicht mehr als Rundgele), aber schmaler als in den bisherigen Flachgel-Systemen ausgeführt. Die Breite des Geles kann durch Wahl verschieden breiter Dichtstreifen, Schläuche etc.) variabel gehalten werden, so daß sowohl analytische als auch mikropräparative Gele gemacht werden können. In den üblichen käuflichen Flachgel-Elektrophorese-Kombikammern werden Fertiggele bestimmter Breiten und Dicken verwandt. Außerdem werden bei dem vorliegenden Verfahren Ampholine (lösliche Zwittermoleküle) anstelle von immobilisierten Zwitterionen (Immobilone) benutzt, um den pH-Gradienten im Gel aufzubauen. Prinzipiell ließen sich in der erfindungsgemäßen Vorrichtung aber auch Immobilone verwenden; jedoch sind die Trenneigenschaften dieser Gele bisher weniger gut als die mit Ampholinen erzeugten.
Vorteile der beschriebenen Elektrophorese-Kombikammern sind:

- Variable Breiten der Gele;
- längere Trennstrecken, ohne daß die Gele beschädigt werden können;
- Einsatz variabler Proteinmengen in der gleichen Apparatur;
- kein Transfer des Geles von der ersten auf die zweite Dimension nötig;
- keine Rehydratisierung wie bei Fertiggelen notwendig;

- bei Verwendung von Fertiggelen keine Anwendung erhöhter Temperatur wie dies bei Rehydratisierungsschritten angewandt wird;
- sowohl Fertiggelstreifen als auch selbst-gegossene Gele können verwendet werden.
- präzise Fixierung des Geles relativ zur 2. Dimension;
- Pufferreservoire mit im Kammersystem eingebunden;
- Kühlung beider Gele routinemäßig durchführbar;
- die Kühlung ermöglicht identische Temperaturprofile für beide Parallelgele durch meanderförmige Zwangsführung des Kühlmediums; keine unterschiedlichen Strömungsverhältnisse;
- Kühlung aller Puffergefäße (für die 1. und 2. Dim);
- Einführung des sog. Stoppgels (dient zur mechanischen nicht aber elektrischen Abtrennung des Geles der ersten Dimension zu einem dazugehörigen Puffergefäß);
- gleichzeitiges Gießen beider Dimensionen möglich; daher Zeitersparnis, da die Gele vor Gebrauch erst polymerisieren müssen; d.h. beide Gele können gleichzeitig auspolymerisieren (z.B. über Nacht) und sind dann frühmorgens gebrauchsfertig;
- die Trennung erfolgt horizontal, nicht vertikal, ohne daß Kippvorgänge notwendig sind. Die Stellung der Kammer ändert sich nicht während des Gelgießens und bei der Elektrophorese. Die Apparatur steht nach der Montage aufrecht, d.h. platzsparend.

Nach Durchführung der ersten Dimension ist neu, daß die Isolierschläuche 9 oder Isolierstreifen 9 ohne Öffnen der Kammer nach der ersten Dimension entfernt werden. Volle Automatisierung ist möglich bei Einsatz eines Schrittmotors zum Entfernen der Isolierelemente 9.
Neu ist ebenfalls die Einführung einer leitenden Kontaktflüssigkeit (z.B. auf Agarose-Basis) in den entstehenden Hohlraum zwischen dem Gel der 1. und der 2 Dim., damit der elektrische Übergang zur 2. Dimension gewähr-

leistet ist ohne daß eine Umpufferung notwendig wird. Die Umpufferung kann aber durchaus stattfinden, indem der entstehende Zwischenraum nach Entfernen der Isolierschläuche 9 mit Pufferlösung gespült wird.

In der zweiten Dimension ist neu, daß das Füllen der Gellösung für die zweite Dimension von unten bei aufrechter Stellung der Elektrophorese-Kombikammer erfolgt. Die Lösung wird automatisch langsam eingefüllt (wegen des Durchmessers der Füllkammer), so daß jegliche Blasenbildung vermieden wird, womit man sonst bei den meisten Kammern zu kämpfen hat.
Neu ist ebenfalls die nach oben angeschrägte Entlüftungsöffnung 18 der 2. Dim., so daß alle Luft entweichen kann.
Dies ist möglich, weil das Gel in der Gelkammer 7 zwar vertikal steht, aber die Proteine horizontal (von rechts nach links oder von links nach rechts, je nach Wahl der Elektrodenanschlüsse) getrennt werden.

Es können in dem System auch sog. Fertiggele, d.h. dehydratisierte Gele in der Elektrophorese-Kombikammer verwendet werden.
Dabei ist auf einer Trägerfolie ein streifenförmiges Gel (1. Dimension) aufgebracht. Neben diesem Streifen ist ein flächiges Gel (2. Dimension) in einem gewissen Abstand aufgebracht.
Die Gele auf der Trägerfolie werden auf Platte 4 über den Kühlementen 3 gelegt.
Anschließend wird die äußere Dichtung 19 sowie die Isolierelemente 9 (je eine links und rechts vom Gel der ersten Dimension) eingesetzt.
Die Glasplatte 5 wird aufgelegt und der Druckrahmen 13 befestigt.
Rehydratisierungslösungen für beide Gele werden in die Puffergefäße 8 und 21 eingefüllt.

Die Gele werden rehydratisiert
Die integrierten Puffergefäße der ersten Dimension werden mit Pufferlösung gefüllt und der Strom eingeschaltet.
Nach Beendigung der Auftrennung werden die Puffer und dann die Isolierelemente 9 entfernt.
Umpufferungslösung kann durchgepumpt werden.
Die Pufferlösung für die zweite Dimension wird eingefüllt
Die zweite Auftrennung wird gestartet.

Eine alternative Konstruktion ist die Verwendung von dünnwandigen, hochelastischen Schläuchen als Isolierelemente 9. Die Abtrennung des freibleibenden Raumes zur Aufnahme des Geles der ersten Dimension wird entweder durch einen Schlauch, der u-förmig (eventuell in einer vorgesehenen Rille in einer der Platten) eingelegt ist, realisiert oder durch zwei Schläuche, die jeweils an einem Ende verschlossen sind. Die Abdichtung erfolgt dadurch, daß der Schlauch mit einem Fluid (Flüssigkeit oder Gas) gefüllt wird. Durch ausreichenden Innendruck erfolgt die Abdichtung gegen die inneren und äußeren Platten 4 und 5. Nach dem Gießen des Stopgeles kann das Gel der ersten Dimension gegossen werden. Die Begrenzung des Geles der zweiten Dimension erfolgt analog mit einem u-förmigen Schlauch oder einem am Ende verschlossenen Schlauch. Nach der Trennung der ersten Dimension wird der Schlauch evakuiert aber nicht aus dem System entfernt. In den entstehenden Raum zwischen erster und zweiter Dimension wird Agarosegelpufferlösung zur Herstellung einer elektrisch leitenden Verbindung zwischen den Gelen eingefüllt. Die anderen Abläufe erfolgen wie oben beschrieben.
Eine vorteilshafte Ausbildung besteht darin, daß dieser Schlauch mit einem Adhäsiv nur auf einer der Platten 4 oder 5 fixiert ist oder auf einer der Platten 4 oder 5

festsitzend in einer Nut geführt ist, so daß sichergestellt wird, daß sich der Schlauch nach der Evakuierung nur auf einer Platte 4 oder 5 befindet.
Eine Variante dieser Konstruktion bzw. der Methode ist es, den Schlauch nach abgelaufener Trennung der ersten Dimension zu entfernen. Durch das Evakuieren wird die Entfernung wesentlich vereinfacht.

Die Erfindung ist nicht beschränkt auf die hier dargestellten Ausführungsbeispiele. Vielmehr ist es möglich, durch Kombination und Modifikation der genannten Mittel und Merkmale weitere Ausführungsvarianten zu realisieren, ohne den Rahmen der Erfindung zu verlassen.

Bezugszeichenliste

1 Elektrophorese-Kombikammer

2 Kern

3 Kühlelemente

4 innere Platte

5 äußere Platte

6 Gelkammer

7 Gelkammer

8 Puffergefäße und Füllkammer für die 2. Dimension samt Einlässen

9 Isolierelemente

10 Kühllabyrinth

11 Zulauf Kühlflüssigkeit

12 Ablauf Kühlflüssigkeit

13 Druckrahmen

14 Deckel

15 Spannelemente

16 Sichtfenster

17a Füllkammern für die 1. Dimension

17b Füllkammer mit Einlaß für die 2. Dimension

18 Entlüftungsöffnungen

19 Flächendichtung

20. Einfüllöffnung für Probe und 1. Dim. Gel

21. Puffergefäße samt Einlässe für 2. Dimension

Patentansprüche

1. Verfahren zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen oder anderen Stoffgemischen in Gelen, Polymerträgern oder für die ein-dimensionale trägerfreie Trennung durch Elektrophorese in einer Elektrophoreseapparatur

 dadurch gekennzeichnet, daß

 -die Gele für die Trennung in der ersten Dimension und die Gele für die Trennung in der zweiten Dimension nacheinander oder gleichzeitig vertikal zueinander angeordnet als Gießgele oder Fertiggele in eine Elektrophorese-Kombikammer eingebracht und voneinander isoliert polymerisiert bzw. rehydratisiert werden,

 -nachfolgend Pufferlösungen eingefüllt, ein Biomolekülgemisch auf die Gele der ersten Dimension aufgetragen und die elektrophoretische Auftrennung der ersten Dimension bei konstanter Temperatur oder bei fixiertem Temperturgradienten durchgeführt,

 -anschließend die Pufferlösung abgesaugt, die Isolierung aufgehoben, in die entstehenden Räume zwischen erster und zweiter Dimension Kontaktgel eingefüllt und auspolymerisiert, Pufferlösungen eingefüllt und die elektrophoretische Trennung der zweiten Dimension bei präzise eingestellter Temperatur und konstanter elektrischer Leistung oder steigender Stromstärke durchgeführt wird und

 -abschließend die Gele entwickelt und die Proteine mit herkömmlichen Methoden sichtbar gemacht werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1,

 dadurch gekennzeichnet, daß

zur Trennung die Gele in der Elektrophorese-Kombikammer vertikal stehen und die Trennung der Proteine in der ersten Dimension vertikal und in der zweiten Dimension horizontal erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Gele der ersten Dimension als Flachgele in einem U-förmigen Rohr gegossen werden, wobei zuerst ein Stoppgel und nachfolgend das Separationsgel gegossen wird und sowohl Gießvorgänge als auch Polymerisationsvorgänge bei konstanter Temperatur mit aktivierter Kühlung erfolgen.

4. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Gele der zweiten Dimension in zwei Schritten gegossen werden derart, daß in einem ersten Schritt ein Dichtgel und nach dessen Polymerisation in einem zweiten Schritt die Gellösung von unten aufsteigend gegossen wird derart, daß die Luft nach oben verdrängt und das Gel anschließend bei konstanter Temperatur mit aktivierter Kühlung polymerisiert wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Breite und die Dicke der Gele variierbar ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Aufhebung der Isolierungen durch körperliches Entfernen von Dichtungen oder Schalten mittels Volumen- bzw. Durchmesserverringerungen von Dichtungsschläuchen realisiert wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

der Ablauf der zweidimensionalen Elektrophorese automatisiert durchgeführt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Gele und die Pufferlösungen von der gleichen Kühlung temperiert werden.

9. Vorrichtung zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen in Gelen durch Elektrophorese in einer Elektrophoreseapparatur,

dadurch gekennzeichnet, daß

eine Elektrophorese-Kombikammer (1) einen Kern (2) mit Kühlelementen (3) aufweist, wobei die Kühlelemente (3) zwischen den beidseitig des Kerns (2) durch innere Platten (4) und äußere Platten (5) im Zusammenwirken mit entfernbaren oder schaltbaren Isolierelementen (9) gebildeten Gelkammern (6,7) und Puffergefäßen (8) angeordnet sind.

10. Vorrichtung nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Kühlelemente (3) durch ein mäanderförmiges Kühllabyrinth (10) mit Zulauf (11) und Ablauf (12) gebildet sind.

11. Vorrichtung nach Anspruch 10,

dadurch gekennzeichnet, daß

das Kühllabyrinth (10) die Puffergefäße (8) und (21) umschließt.

12. Vorrichtung nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet, daß

die inneren Platten (4) aus einem gut temperaturleitenden Material und die äußeren Platten (5) aus einem transparenten Material bestehen.

13. Vorrichtung nach Anspruch 12,

dadurch gekennzeichnet, daß

die inneren Platten (4) aus Keramik oder Kunststoff und die äußeren Platten (5) aus Glas oder transparentem Kunststoff bestehen.

14. Vorrichtung nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet, daß

die äußeren Platten (5) durch einen Druckrahmen (13) gehalten werden und ein Deckel (14) die Elektrophorese-Kombikammer (1) nach oben abschließt.

15. Vorrichtung nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet, daß

der Druckrahmen (13) über Spannelemente (15) beidseitig befestigt wird und Sichtfenster (16) zur Prozeßkontrolle aufweist.

16. Vorrichtung nach Anspruch 1, 9 oder 14,

dadurch gekennzeichnet, daß

die untere Begrenzung der Elektrophorese-Kombikammer (1) durch einen justier- und drehbaren Tisch realisiert ist, auf welchem die Elektrophorese-Kombikammer (1) fixiert ist.

17. Vorrichtung nach Anspruch 14,

dadurch gekennzeichnet, daß

der Deckel (14) Ein- und Ausleitungen für das Kühlmedium sowie zu den Puffergefäßen (8) und Gelkammern (6,7) und die Anschlüsse für die Elektroden der 1. und 2. Dimension aufweist.

18. Vorrichtung nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet, daß

der Kern (2) aus Polymermaterial wie Acrylglas, Keramik oder Plexiglas besteht.

19. Vorrichtung nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Gelkammern (6,7) mit Füllrohren (17) verbunden sind und Entlüftungsöffnungen (18) angeordnet sind.

20. Vorrichtung nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet, daß

zwischen inneren Platten (4) und äußeren Platten (5) Dichtungen (19) angeordnet sind.

21. Vorrichtung nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Isolierelemente (9) mit Vertiefungen zusammenwirken.

22. Vorrichtung nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet,

daß die die Medien Gele und/oder Gellösungen und/oder Pufferlösungen berührenden Teile der Elektrophorese-Kombikammer (1) oberflächenbeschichtet sind.

23. Vorrichtung nach Anspruch 22,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Oberflächenbeschichtung aus amorphen Kohlenstoffschichten besteht oder durch Silanisieren realisiert wird.

24. Vorrichtung zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen oder anderen Substanzgemischen in Gelen, Polymeren oder trägerfreien Medien durch Elektrophorese in einer Elektrophoreseapparatur,

dadurch gekennzeichnet,

daß alle für die Durchführung einer zwei-dimensionalen Trennung notwendigen Baugruppen in einer Elektrophorese-Kombikammer 1, bestehend aus einem Kern 2 mit Kühlelementen 3, wobei die Kühlelemente 3 zwischen den beidseitig des Kerns durch innere Platten 4 und äußere Platten 5 im Zusammenwirken mit entfernbaren oder schaltbaren Isolierelementen 9 gebildeten Trennkammern 6, 7, Puffergefäße 8, 21 und Aufnahmen für Elektroden angeordnet sind, vollständig integriert sind und die Durchführung der zwei-dimensionalen Auftrennung vollständig automatisiert werden kann, ohne daß im Ablauf der zwei-dimensionalen Trennung eine Manipulation an den Gelen selber erfolgt.

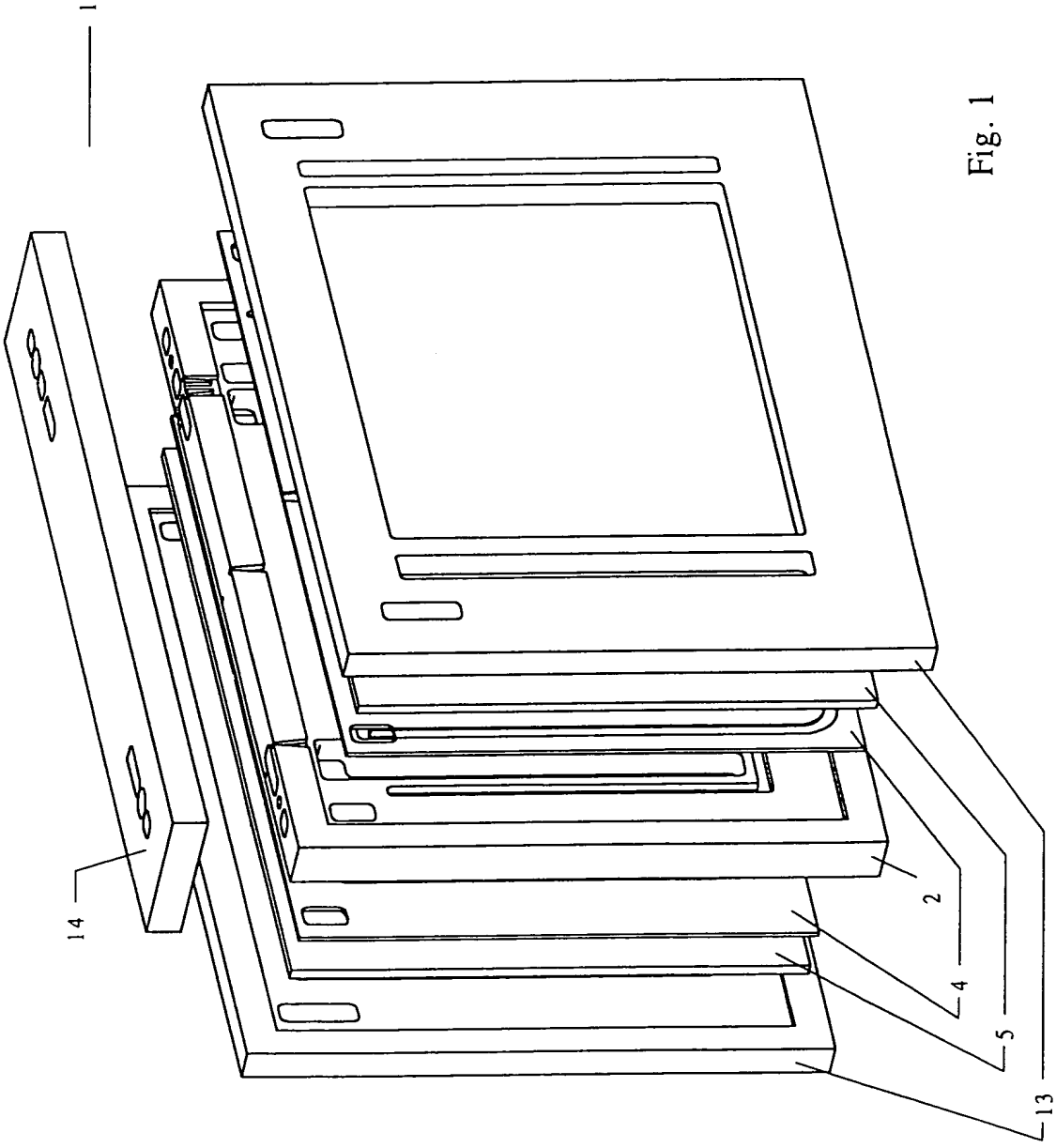


Fig. 1

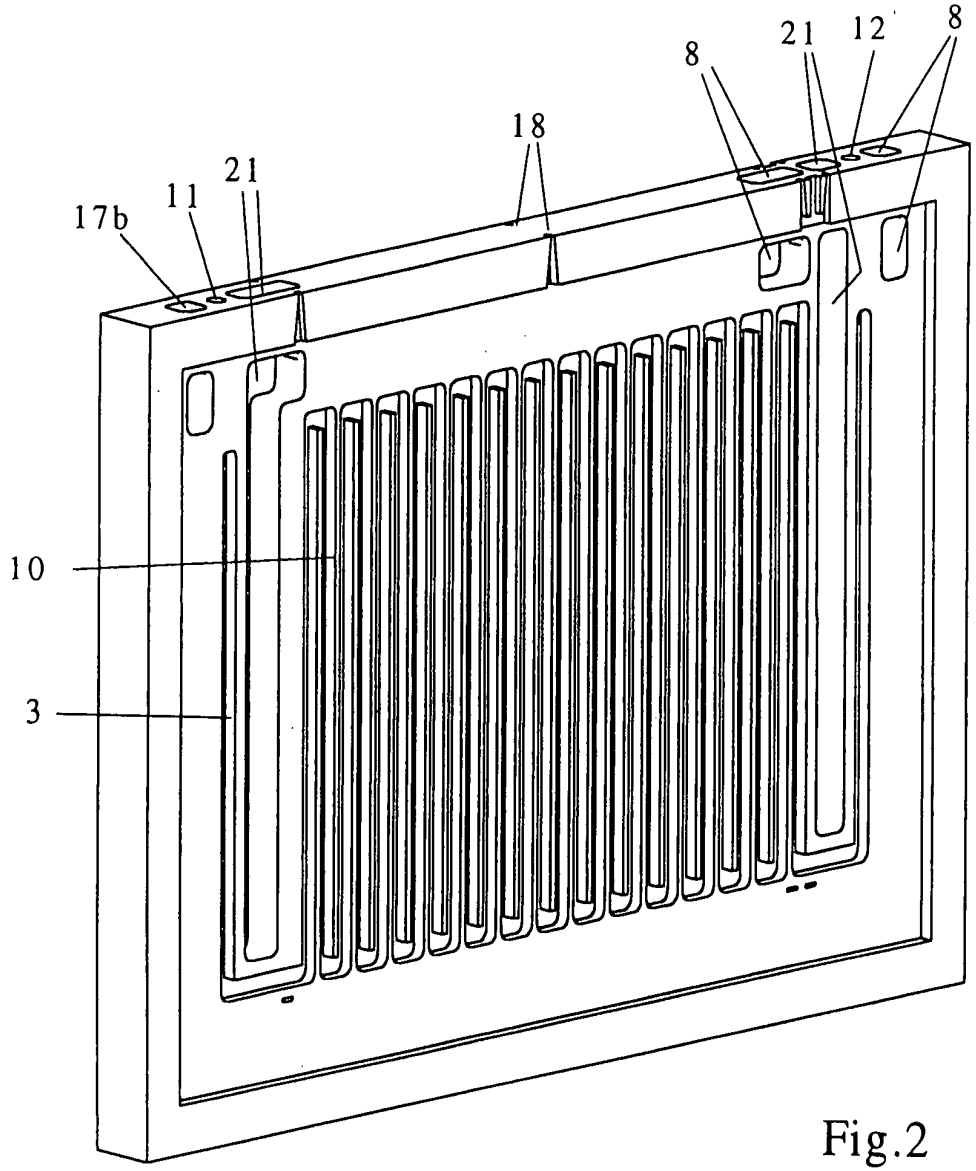


Fig.2

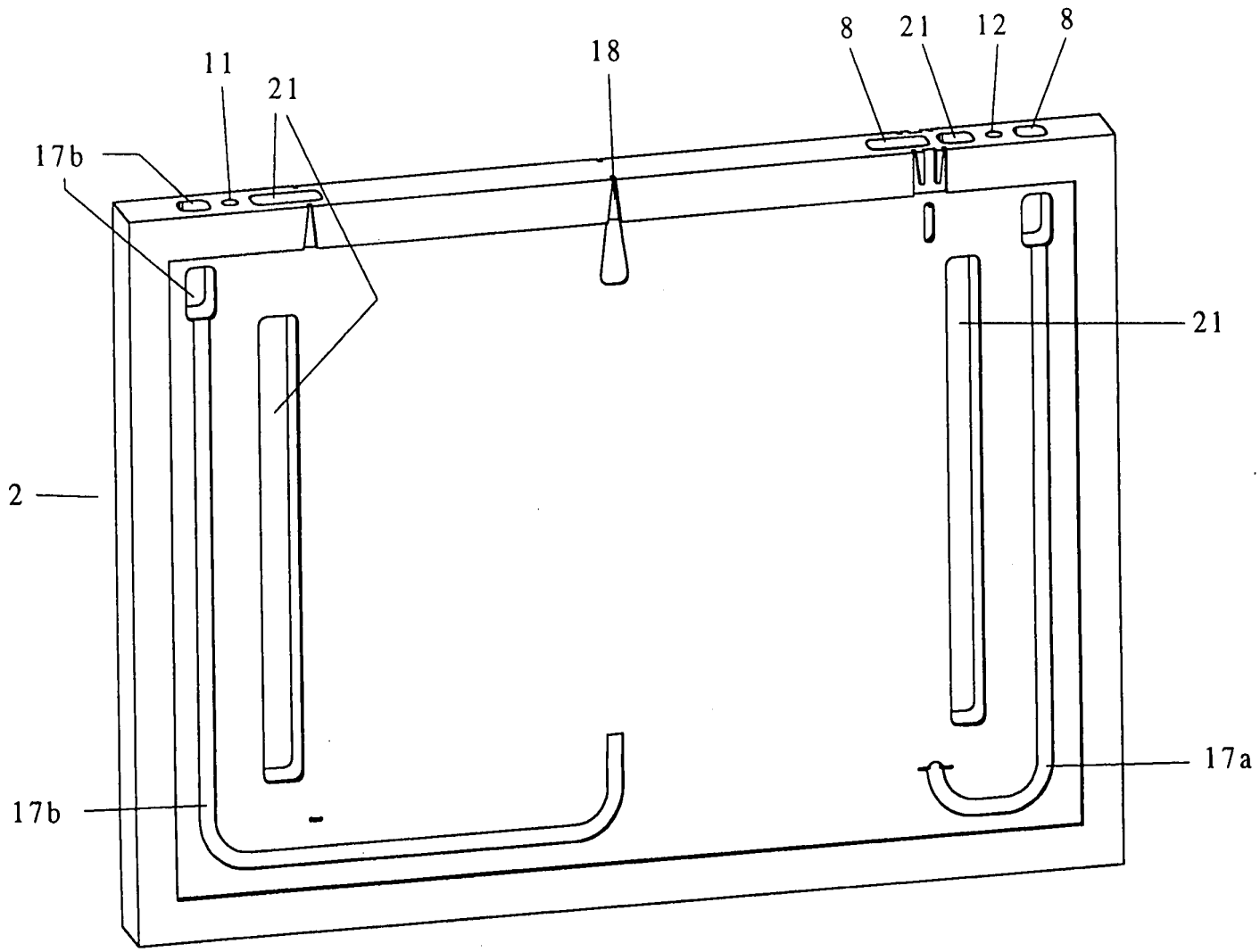


Fig.3

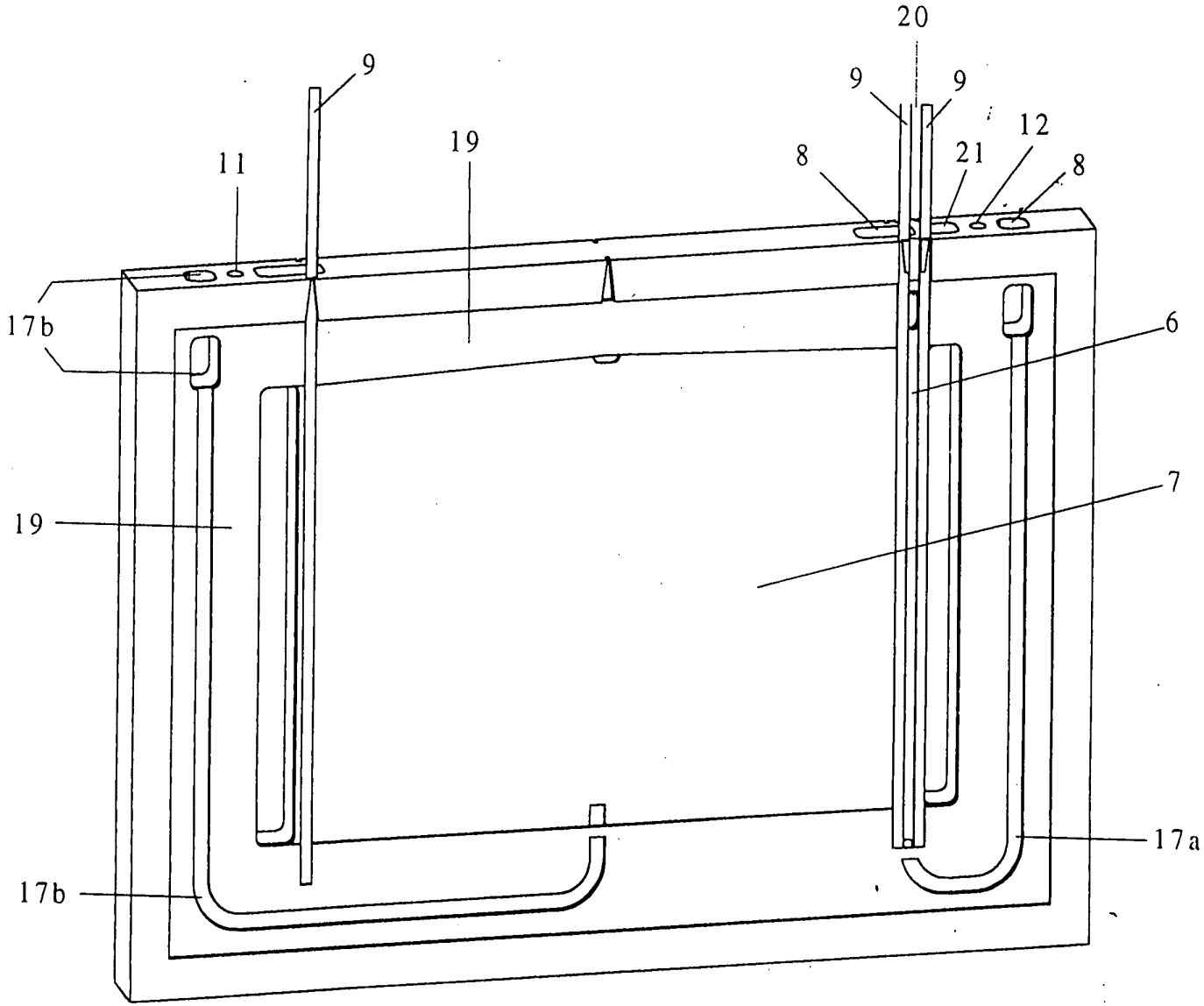


Fig.4

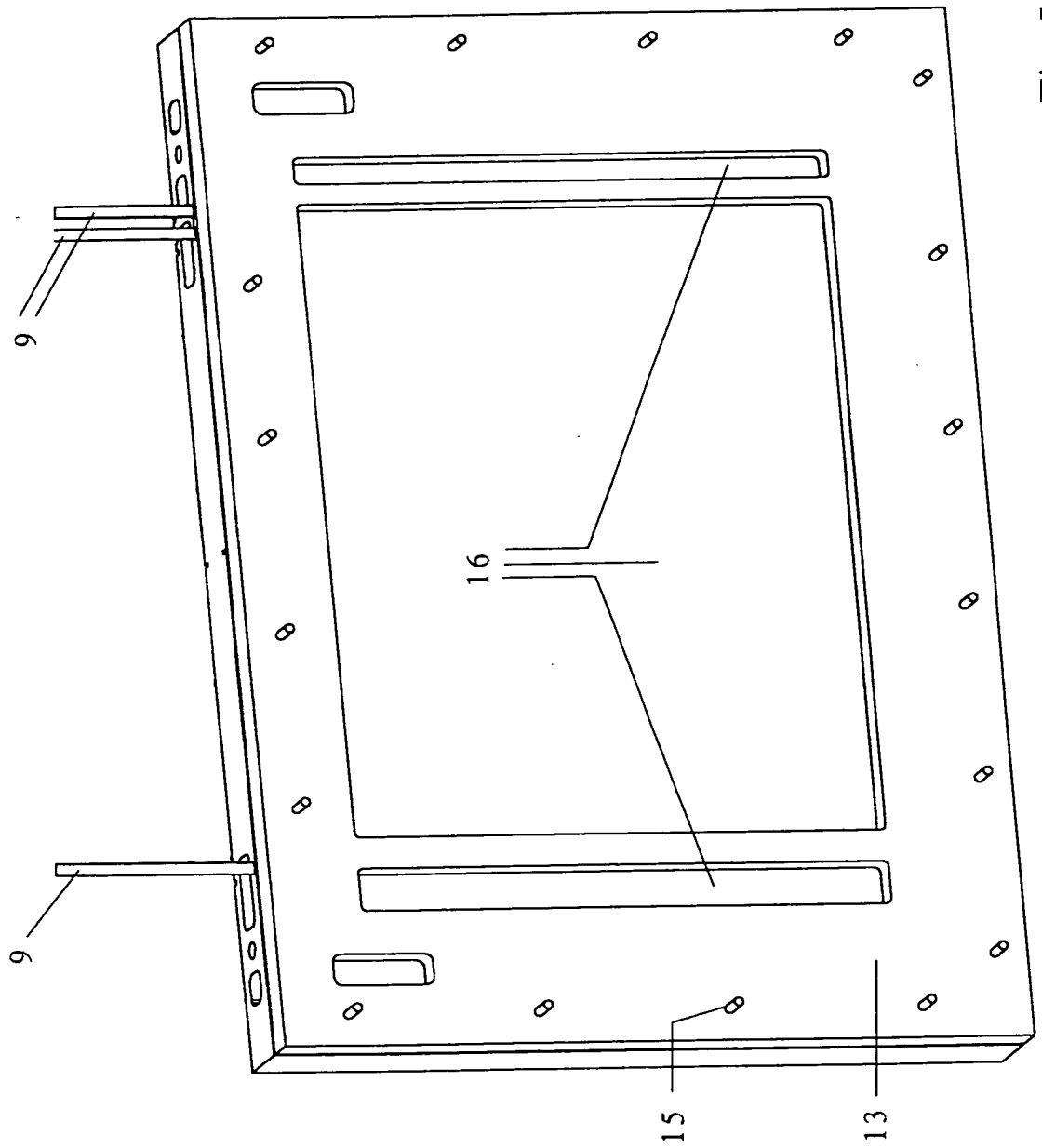


Fig.5

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen in Gelen durch Elektrophorese in einer Elektrophoreseapparatur und dient insbesondere der Auftrennung von beispielsweise Proteinen, Glycoproteinen, Lipoproteinen, Nukleinsäuren oder Zellkomplexen. Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, daß eine Elektrophorese-Kombikammer (1) einen Kern (2) mit Kühlelementen (3) aufweist, wobei die Kühlelemente (3) unter den beidseitig des Kerns (2) durch innere Platten (4) und äußere Platten (5) im Zusammenwirken mit entfernbaren oder schaltbaren Isolierelementen (9) gebildeten Gelkammern (6,7) und Puffergefäßen (8 und 21) angeordnet sind.
(Fig. 1)